

Support for the purification and separation of proteins, process of preparation and application in chromatography

Support for the purification and separation of proteins, process of preparation and application in chromatography

Patent Number: FR2605237
Publication date: 1988-04-22
Inventor(s): SEBILLE BERNARD;; MAHIEU JEAN-PIERRE;; MILLOT MARIE-CLAUDE
Applicant(s): CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)
Requested Patent: ☐ FR2605237
Application Number: FR19860014516 19861020
Priority Number(s): FR19860014516 19861020
IPC Classification:
EC Classification: B01D15/08, B01J20/32
EC Classification: B01D15/08; B01J20/32
Equivalents:

Abstract

Protein purification and separation. The support for the purification and separation of proteins consists of a porous solid on which a film of a polymer derived from polyvinylimidazole containing thiol functions and activated by a disulphide is deposited. According to the process of the invention the porous solid is impregnated with a solution of polyvinylimidazole, is rinsed, and a chain carrying a thiol functional group on the nitrogen atom in position 3 of the imidazole nucleus is introduced, and activation is carried out with a disulphide. Application to covalency chromatography.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 605 237**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **86 14516**

⑤1 Int Cl⁸ : B 01 D 15/08; C 07 K 3/20; C 08 F 8/34,
126/06; G 01 N 30/48.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②2 Date de dépôt : 20 octobre 1986.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 16 du 22 avril 1988.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Bernard Sebille ; Jean-Pierre Mahieu ; Ma-
rie-Claude Millot.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Office Picard.

⑤4 Support pour la purification et la séparation des protéines, procédé de préparation et application en chr matogra-
phie.

⑤7 L'invention concerne la purification et la séparation des
protéines.

Le support pour la purification et la séparation des pro-
téines, est constitué par un solide poreux sur lequel est
déposée une pellicule d'un polymère dérivé de polyvinylimida-
zole comportant des fonctions thiol, activé par un disulfure.

Suivant le procédé de préparation, on imprègne le solide
poreux au moyen d'une solution de polyvinylimidazole, on rince,
on introduit une chaîne portant une fonction thiol sur l'atome
d'azote en position 3 du noyau imidazole, et on active par un
disulfure.

Application à la chromatographie de covalence.

R 2 605 237 - A1

La présente invention concerne un nouveau support pour la purification et la séparation de protéines, et plus particulièrement un nouveau support constitué par un solide poreux portant une pellicule d'un polymère, utilisable notamment pour la purification et la séparation de protéines par chromatographie de covalence.

La chromatographie de covalence fait intervenir une réaction chimique créant une liaison covalente entre la molécule que l'on cherche à séparer et les groupes réactifs du support. Pour favoriser une fixation rapide et complète de la molécule à isoler, en particulier dans le cas d'une macromolécule biologique telle qu'une protéine, on procède à une activation des groupes du support susceptibles de réagir.

Ainsi un support pour chromatographie de covalence peut être un solide ou un gel possédant des fonctions thiol, activé par un disulfure de haute réactivité comme le 2- ou le 4-disulfure de pyridine. Ce gel activé peut réagir, dans une première étape, avec les fonctions thiol de la protéine en libérant une thione et en fixant par covalence la protéine par un pont disulfure. Dans une deuxième étape, on fait agir un réducteur qui libère la protéine, tandis que le gel peut être régénéré par une solution de disulfure de pyridine. On peut ainsi effectuer une purification ou une séparation chromatographique par la fixation sélective des protéines ayant des groupes thiol réactifs et accessibles, au cours de la première étape, tandis que les macromolécules dépourvues de groupe thiol, ou insuffisamment réactives, ne sont pas retenues par le support.

Les supports utilisés dans ces techniques connues peuvent être des gels de dextrane, d'agarose, d'amidon, des dérivés cellulosiques, ou encore des polymères synthétiques tels que des polyamides et des polyacrylamides, qui peuvent être modifiés pour y introduire des fonctions thiol, et activés comme décrit ci-dessus. Par exemple, on connaît un gel obtenu par greffage de glutathion sur de l'agarose activé au bromure de cyanogène, ainsi qu'un gel obtenu par réaction de l'épichlorhydrine sur l'agarose, suivie d'un traitement au thiosulfate.

Toutefois, ces gels présentent de médiocres propriétés mécaniques qui limitent la vitesse, et donc la rentabilité, de la purification ou de la séparation, en particulier dans les extractions chromatographiques s'effectuant sous pression.

5 Les oxydes minéraux, tels que la silice ou l'alumine, utilisés comme phase fixe dans les colonnes de chromatographie, possèdent généralement de bonnes propriétés mécaniques, mais, n raison de leurs propriétés d'adsorptions non spécifiques des macromolécules, il n'est pas possible de les utiliser pour la séparation des protéines.

10 La présente invention a pour objet un nouveau support rigide utilisable en chromatographie de covalence, permettant d'effectuer la purification et la séparation dans de bonnes conditions de rapidité et de rendement, en évitant les adsorptions irréversibles.

15 L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un support ainsi que son application à la chromatographie de covalence pour la purification et la séparation de protéines et à la détection des composés portant des groupes thiol.

20 Le support pour la purification et la séparation des protéines suivant la présente invention est du type comportant un solide poreux sur lequel est déposée une pellicule d'un polymère, et se distingue en ce que le polymère est un dérivé de polyvinylimidazole comportant des fonctions thiol, activé par un disulfure.

25 Il est possible d'utiliser un polyvinylimidazole ne comportant pas initialement de groupe thiol et d'y greffer des groupes thiol suivant les méthodes connues. Le polyvinylimidazole utilisé dans la présente invention peut être choisi parmi les polymères connus dans la technique, pourvu qu'ils comportent un
30 groupe thiol ou que l'on puisse y greffer un tel groupe. De plus, le polyvinylimidazole de l'invention peut être quaternisé sur l'atome d'azote du noyau imidazol.

Suivant une forme préférentielle de réalisation de
35 l'invention, le polyvinylimidazole est un polymère comportant l'unité récurrente ci-après:



5

dans laquelle A représente un groupe divalent comportant de 1 à 20 atomes de carbone, et pouvant comporter des fonctions éther et hydroxy, et R₁ est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle.

Par exemple, A peut être une liaison méthylène -CH₂- ou un
10 groupe divalent de formule -CH₂-CHOH-CH₂O-(CH₂)_n-OCH₂- dans laquelle n est un entier de 2 à 6.

Le procédé conforme à la présente invention consiste à imprégner un solide poreux approprié au moyen d'une solution de polyvinylimidazole, rincer, introduire une chaîne A portant une
15 fonction thiol sur l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole, et activer par un disulfure.

L'introduction de la chaîne A portant une fonction thiol peut se faire par toute méthode connue. On peut par exemple la réaliser avantageusement en effectuant une quaternisation sur
20 l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole. La quaternisation de l'atome d'azote du noyau imidazole peut s'effectuer au moyen d'un agent alkylant choisi parmi ceux connus dans la technique, que l'on fait agir sur le polyvinylimidazole, de préférence déposé sur le support poreux. L'agent alkylant utilisé
25 dans l'invention peut être par exemple un hydrocarbure dihalogéné réactif tel que le diiodométhane, ou un époxyde portant une fonction réactive. Suivant la présente invention, on utilise de préférence un époxyde tel que l'épichlorhydrine, le 1,4-butanediol diglycidyl éther, le 1,3-butanedione diépoxyde, ou
30 l'éthylène glycol diglycidyléther. Il peut être préférable d'opérer en deux étapes, c'est-à-dire de faire d'abord réagir un agent alkylant comme indiqué ci-dessus, puis d'introduire la fonction thiol.

L'introduction des fonctions thiol sur le polyvinylimidazole se fait de préférence après la réaction indiquée ci-dessus.
35 Diverses méthodes connues peuvent être utilisées et on peut par exemple faire agir sur le polyvinylimidazole déposé sur le

support poreux, un thiosulfate de métal alcalin, tel qu le thiosulfate de sodium, puis un réducteur des liaisons S-S formées, tel que le dithioérythritol, le dithiothréitol, ou le mercaptoéthanol, pour former des groupes terminaux -SH.

5 Le support ainsi constitué est activé, par exemple par un disulfure, et de préférence un disulfure aromatique de formule générale R-S-S-R dans laquelle R est un groupe aromatique, tel que le 2- ou le 4-disulfure de pyridine ou l'acide dithionitrobenzoïque, pour pouvoir être utilisé comme phase stationnaire en
10 chromatographie de covalence.

La masse moléculaire du polyvinylimidazole peut varier dans un domaine important, mais elle est généralement comprise entre 20.000 et 200.000 environ, ces valeurs n'étant pas limitatives.

Le solide utilisé comme support est un solide poreux tel
15 qu'un oxyde minéral, comme l'alumine, la silice, l'oxyde de titane ou l'oxyde de zirconium, ou des dérivés tels que des silicates ou des zéolites. Les caractéristiques physiques du support sont choisies en fonction de l'application envisagée. On utilise de préférence une silice comportant des particules dont
20 le diamètre poreux moyen peut être compris entre 5 et 500nm, et la granulométrie peut varier de quelques microns à quelques mm.

Le support conforme à la présente invention, préparé comme indiqué ci-dessus, peut être utilisé pour la purification ou la séparation de diverses protéines comportant des groupes thiol,
25 telles que la mercaptoalbumine bovine, la papaïne, l'uréase, l'albumine humaine, la streptolysine, ou un peptide contenant des groupes thiol, ces protéines étant sélectivement fixées tandis que les protéines dépourvues de fonction thiol réactive sont éluées; il suffit ensuite de faire agir un réducteur tel
30 que le dithioérythritol pour libérer les protéines adsorbées.

Il devient ainsi possible d'isoler environ 30mg de protéine par gramme de support suivant l'invention, dans une colonne d chromatographie de covalence, n moins de deux heures.

Le support suivant la présente invention peut également
35 être appliqué à la détection spécifique des thiols par coloration. Ainsi, il est possible d'utiliser le support ci-dessus, imprégné d'un polyvinylimidazole portant une fonction thiol et

activé par un disulfure ayant un chromophore tel qu'un noyau pyridinique ou aromatique, pour révéler la présence de thiols dans une solution au contact de laquelle il est placé.

Cette coloration peut être réalisée dans une colonne de
5 petite taille, par exemple 1 à 2 cm, ce qui permet de détecter des composés portant des groupes thiol après leur séparation chromatographique. La faible dimension de la colonne et la faible granulométrie du support permettent d'éviter tout élargissement du signal dû à la présence des thiols. Les courbes
10 d'étalonnage enregistrées à partir de plusieurs molécules montrent que le signal obtenu au moyen d'un détecteur chromatographique usuel est proportionnel à la quantité de composé dans un domaine allant de 0,5pM à 500nM environ.

Le support conforme à l'invention possède l'avantage de ne
15 présenter aucune adsorption irréversible vis à vis des protéines, et peut donc être utilisé sans restriction avec des solutions contenant des macromolécules biologiques.

Les exemples ci-après illustrent l'invention plus en détail sans en limiter la portée.

20

EXEMPLE 1

Préparation du support

10g de silice (Silice Licrospher Merck; porosité : 30nm; diamètre moyen des particules : 10µm) sont mis en suspension dans 100 ml d'une solution méthanolique à 10% de polyvinylimida-
25 zole de masse moléculaire égale à 100.000 environ, préparé selon la méthode de G.G. Skovortsova et al. "Polymer Science URSS" A14, n°3 p 587-597 (1972).

L'imprégnation est maintenue pendant 48 heures environ, puis on rince avec 500 ml d'eau. On obtient ainsi une silice
30 imprégnée de polyvinylimidazole, contenant 7,5% en poids de carbone et 3,4% en poids d'azote.

10 g de la silice ainsi imprégnée sont placés dans 100 ml de méthanol et on ajoute progressivement 8 ml d'épichlorhydrine. La suspension est maintenue sous agitation à température
35 ambiante pendant 10 mn, puis elle est portée à 50°C pendant 50 mn. On filtre la silice ainsi traitée, et on rince avec 100 ml de méthanol puis 100 ml d'eau.

Après rinçage, la silice est mise en suspension dans une solution aqueuse tamponnée à pH 6,3 (tampon phosphate de sodium 0,5 M), puis on fait agir 10g de thiosulfate de sodium. Après 6 heures, le solide est filtré, puis mis en suspension dans 50 ml d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à pH 8 contenant 2mg de dithioérythritol.

La silice modifiée ainsi obtenue, après filtration, contient 10^{-5} groupe -SH par gramme.

On vérifie qu'aucune adsorption de protéine n'est observée quand on fait passer sur cette silice une solution de chlorure de sodium (0,5 M) contenant des protéines.

On active ensuite 1g de silice modifiée obtenue comme indiqué ci-dessus en faisant agir 0,5g de 2-disulfure de pyridine dans 500 ml de mélange tampon phosphate de sodium 0,1M - éthanol (50/50 vol).

EXEMPLE 2

Purification de la sérum albumine bovine

La silice modifiée et activée préparée dans l'exemple 1 est utilisée comme phase stationnaire d'une colonne de chromatographie (longueur : 5cm; diamètre intérieur : 4mm). L'éluant utilisé est un tampon phosphate 0,15M - NaCl M - EDTA 10^{-3} M, à pH 8.

Une solution d'albumine (3g/l) est injectée en continu sur la colonne par un dispositif usuel de pompage. On observe une absorption à 350 nm, caractéristique de la libération d'une thione provenant de la réaction de protéines à groupes thi l avec la silice modifiée et activée.

Les protéines dépourvues de fonction thiol réactive sont éluées au moyen d'une solution tampon comme ci-dessus, tandis que la mercaptoalbumine présente est spécifiquement retenue sur la colonne.

Après rinçage, on injecte sur la colonne une solution de 10 ml d dithioérythritol (10^{-2} M) pour libérer la mercaptoprotéine qui est recueillie (volume : 2 ml).

L'analyse du produit obtenu montre que le taux de thiol dans la protéine, après purification chromatographique comme indiqué ci-dessus, est voisin de 1 SH par molécule, tandis que

le taux initial, mesuré avant l'injection de la protéine dans la colonne, est de 0,5 environ.

EXEMPLE 3

On procède comme dans l'exemple 1 en utilisant une silice
5 Nucleosil (porosité: 30nm) que l'on imprègne de polyvinylimidazole et que l'on traite de la même façon par l'épichlorhydrine, puis par le thiosulfate de sodium et enfin par le dithioérythritol.

La silice modifiée ainsi obtenue, après filtration,
10 contient $3 \cdot 10^{-6}$ groupe SH par gramme.

L'activation est faite au moyen du 2-disulfure de pyridine comme dans l'exemple 1.

Cette silice modifiée est utilisée comme phase stationnaire d'une colonne de chromatographie de covalence, dans les mêmes
15 conditions que dans l'exemple 2. On fixe ainsi, par gramme de silice modifiée, 21mg de mercaptoalbumine bovine qui est récupérée en totalité après injection sur la colonne de 10 ml de dithioérythritol.

EXEMPLE 4

20 On procède comme dans l'exemple 1, en utilisant la même silice et le même polyvinylimidazole, mais on remplace l'épichlorhydrine par le 1,4-diglycidyl éther.

Le traitement par le thiosulfate puis par le dithioérythritol, et l'activation par le disulfure, s'effectuent dans les
25 mêmes conditions que dans l'exemple 1.

Le nombre de groupes SH par gramme de silice, mesuré avant activation, est d'environ $6 \cdot 10^{-6}$.

L'utilisation de la silice modifiée ainsi obtenue dans une colonne de chromatographie de covalence identique à celle de
30 l'exemple 2 permet de séparer sélectivement la mercaptoalbumine dans une solution d'albumine (protéine adsorbée: 37mg/g de silice; protéine libérée après injection d dithioérythritol: 100%).

EXEMPLE 5

35 On répète le processus de l'exemple 4 ci-dessus en remplaçant le 1,4-butanediol diglycidyl éther par l'éthylène glycol diglycidyl éther.

La quantité de protéine adsorbée est de 30ng/g de silice. La protéine est ensuite récupérée quantitativement après injection dans la colonne de dithioérythritol.

EXEMPLE 6

Détection de thiols

5 La silice modifiée et activée préparée dans l'exemple 1 est utilisée comme phase stationnaire d'une colonne de chromatographie (longueur: 5cm; diamètre intérieur: 4mm). L'éluant utilisé est un mélange de 80% de tampon phosphate 0,15M - NaCl 0,2M -
10 EDTA 10^{-3} M à pH 7,5, et de 20% d'acétonitrile.

Une solution d'un thiol non coloré est injectée par l'intermédiaire d'une vanne d'injection de type connu (Rhéodyne modèle 7125). Dans cet exemple, on effectue trois essais avec
15 successivement le dithioérythritol (DTE), la L-cystéine (L-cyst) et le glutathion réduit (G-SU) en une concentration variant de 10^{-3} M à 10^{-5} M. Il apparaît à la sortie de la colonne un pic repéré par son absorption à 350nm, caractéristique de la libération d'une thione (4-thioxypyridine) provenant de la réaction
20 d'échange entre le disulfure supporté sur la colonne modifiée et activée (4,4'-disulfure de pyridine) et le thiol injecté.

Une courbe d'étalonnage est établie en portant la surface du pic obtenu en fonction de la quantité de thiol injectée. Cette courbe est linéaire de 0,5pM à 20nM environ.

25 Au préalable, un étalonnage effectué par injection de thione (4-thioxypyridine) a été réalisé sur la silice modifiée et activée préparée dans l'exemple 1, qui ne présente aucune propriété de fixation irréversible de la thione.

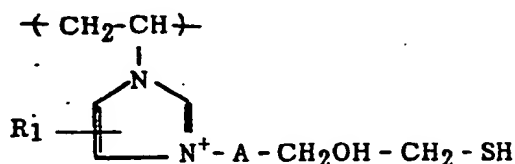
La comparaison des deux courbes d'étalonnage permet de
30 calculer le rendement de la réaction du thiol avec le support activé pour former la thione. Ce rendement est voisin d 100% pour le DTE et la L-cyst, et de 75% pour le G-SU.

Le minimum de quantité détectable avec un détecteur UV de type connu (Shimadzu modèle SPD-6A) est de 0,5pM pour le DTE.

REVENDICATIONS

1. Support pour la purification et la séparation des protéines, comportant un solide poreux sur lequel est déposée une pellicule d'un polymère, caractérisé en ce que le polymère est un dérivé de polyvinylimidazole comportant des fonctions thiol, activé par un disulfure.

2. Support selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polyvinylimidazole est un polymère comportant l'unité récurrente ci-après:



dans laquelle A représente un groupe divalent comportant de 1 à 20 atomes de carbone, et pouvant comporter des fonctions éther et hydroxy, et R₁ est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle.

3. Support selon la revendication 2, caractérisé en ce que le groupe A est une liaison méthylène -CH₂- ou un groupe divalent de formule -CH₂-CHOH-CH₂O-(CH₂)_n-OCH₂- dans laquelle n est un entier de 2 à 6.

4. Support selon la revendication 1, caractérisé en ce que le solide poreux est choisi parmi l'alumine, la silice, l'oxyde de titane, l'oxyde de zirconium, un silicate ou une zéolite.

5. Support selon la revendication 4, caractérisé en ce que le solide poreux est de la silice comportant des particules dont le diamètre poreux moyen est compris entre 5 et 500nm, et la granulométrie est comprise entre quelques microns et quelques millimètres.

6. Procédé de préparation d'un support selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on imprègne le solide poreux au moyen d'une solution de polyvinylimidazole, on rince, on introduit une chaîne portant une fonction thiol sur l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole, et on active par un disulfure.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la chaîne portant une fonction thiol est introduite après

quaternisation de l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la quaternisation est effectuée au moyen d'un agent alkylant
5 choisi parmi un hydrocarbure dihalogéné réactif et un époxyde portant une fonction réactive.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'époxyde est choisi parmi l'épichlorhydrine, le 1,4-butane-
diol diglycidyl éther, le 1,3-butanedione diépoxyde, et
10 l'éthylène glycol diglycidyléther.

10. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le disulfure est choisi parmi le 2- ou le 4-disulfure de pyridine et l'acide dithionitrobenzoïque.

11. Support pour chromatographie de covalence, pour la
15 séparation et la purification de protéines, caractérisé en ce qu'il comprend un support selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

12. Support pour la détection spécifique de thiols par coloration, caractérisé en ce qu'il comprend un support s lon
20 l'une quelconque des revendications 1 à 5.

25

30

35